

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 April 2001 (09.04.01)	Applicant's or agent's file reference M/40434-PCT
International application No. PCT/EP00/07252	Priority date (day/month/year) 27 July 1999 (27.07.99)
Applicant HAUER, Bernhard et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
22 February 2001 (22.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">Peggy Steunenber</p> Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07574 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53, 15/70, 9/02, 1/21, C12P 7/42 // (C12N 1/21, C12R 1:19)
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07252
- (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 2000 (27.07.2000)
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67056 Fussgönheim (DE). PLEISS, Juergen [DE/DE]; Ostlandstrasse 13, D-71679 Asperg (DE). SCHWANEBERG, Ulrich [DE/DE]; Uhlandstrasse 15, D-71336 Waiblingen (DE). SCHMITT, Jutta [DE/DE]; Fuggerstrasse 19, D-70563 Stuttgart (DE). FISCHER, Markus [DE/DE]; Uhlandstrasse 14, D-71638 Ludwigsburg (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; Sylvanerweg 6, D-70329 Stuttgart (DE). LI, Qing-shan [JP/JP]; Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 (JP).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 35 115.5 27. Juli 1999 (27.07.1999) DE
100 11 723.6 10. März 2000 (10.03.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MODIFIED CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES

(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE CYTOCHROM P450-MONOOXYGENASEN

(57) Abstract: The invention relates to modified cytochrome P450 monooxygenases comprising a modified substrate profile, to nucleic acid sequences that code therefor, to expression constructs and vectors, and to recombinant microorganisms which contain these vectors. The invention also relates to methods for microbiologically producing terminally or subterminally hydroxylated aliphatic carboxylic acids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen, Expressionskonstrukte und Vektoren, rekombinante Mikroorganismen, welche diese Vektoren enthalten sowie Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung terminal oder subterminal hydroxylierter aliphatischer Carbonsäuren.



WO 01/07574 A3



(74) **Anwälte:** KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, D-81679 München, Sternwartstrasse 4 (DE).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AU, CA, CN, JP, NO, US.

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts:

9. August 2001

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

PCT/EP 00/07252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N15/70 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/42
//(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAVES SHELLEY A ET AL: "Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450-BM-3." FEBS LETTERS, vol. 414, no. 2, 1997, pages 213-218, XP002155913 ISSN: 0014-5793 the whole document --- -/--	1-3, 7-12,16, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2000

Date of mailing of the international search report

14.03.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

HORNIG H.

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxxygenase."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 2, 1997, pages 1127-1135, XP002155914</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>the whole document</p>	1-3, 7-13,16, 17
X	<p>---</p> <p>TRUAN GILLES ET AL: "Thr268 in substrate binding and catalysis in P450BM-3."</p> <p>ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 349, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 53-64, XP002155915</p> <p>ISSN: 0003-9861</p> <p>the whole document</p>	1,2,7-11
X	<p>---</p> <p>YEOM HYEYEONG ET AL: "The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450-BM-3."</p> <p>BIOCHEMISTRY, vol. 34, no. 45, 1995, pages 14733-14740, XP002155916</p> <p>ISSN: 0006-2960</p> <p>the whole document</p>	1,2,7-11
X	<p>---</p> <p>KLEIN M L ET AL: "CRITICAL RESIDUES INVOLVED IN FMN BINDING AND CATALYTIC ACTIVITY IN CYTOCHROME P450BM-3"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 268, no. 10, 5 April 1993 (1993-04-05), pages 7553-7561, XP000565661</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>the whole document</p>	1,2,7-11
X	<p>---</p> <p>GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC)</p> <p>8 May 1996 (1996-05-08)</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,2,7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

PCT/EP 00/07252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHWANEBERG U ET AL: "P450 monooxygenase in biotechnology - I. Single-step, large-scale purification method for cytochrome P450 BM-3 by anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 848, no. 1-2, 2 July 1999 (1999-07-02), pages 149-159, XP004172008 ISSN: 0021-9673 the whole document ---	
P,X	WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK () 2 June 2000 (2000-06-02) claims 1-20 -----	1-3,7-11

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims Nos. 1, 2 (in full), 3, 6-13, 15-17 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1, 2 (in full) 3, 6-13, 15-17 (in part)

Modified cytochrome P450 monooxygenase which, due to the site-specific mutagenesis of the substrate-binding area thereof, exhibits, in comparison to the wild type, a modified substrate profile during the terminal and/or subterminal enzymatic hydroxylation of aliphatic carboxylic acids;
said enzyme derived from cytochrome P450 monooxygenases of bacterial origin; said enzyme derived from *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2, which comprises at least one functional mutation in one of the following amino acid sequence domains: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224 and 352-356, with the provision that more than one of these domains is mutated when the enzyme carries the mutation F87A; said monooxygenase characterized in that it exhibits a single V26T amino acid substitution; nucleic acid that codes for said monooxygenase; expression construct containing said nucleic acid; vector comprising said expression product; recombinant microorganism that is transformed with at least one said vector; said microorganism which is selected among bacteria of the genus *Escherichia*; method for preparing terminal or subterminal hydroxylated aliphatic carboxylic acids using said monooxygenase that is characterized by a single V26T amino acid substitution; said method which is characterized in that a C8-C30 monocarboxylic acid or a derivative thereof is used as a hydroxylatable carboxylic acid; said method which is characterized in that the reaction is carried out in the presence of an electron donor or reduction equivalent selected among NADH, NADPH and Zn/Co(III)sepulchrate.

2. Claims Nos. 3, 6-13, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution R47R.

3. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution S72G.

4. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution A74G.

5. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution F87V.

6. Claims Nos. 3, 6-13, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution L188z, wherein z represents an amino acid selected among K, R, W, Q, N, G, A and S.

7. Claims Nos. 3, 6-13, 15-17 (in part)

As in Invention No. 1, but limited to a monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and with a single amino acid substitution M354T.

8. Claims Nos. 3-5, 7-14, 16, 17 (in part)

Monooxygenase of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in the amino acid domains 86-88 and 172-224; said monooxygenase characterized in that it has an amino acid substitution mutant F87V; nucleic acid that codes for said monooxygenase; expression construct that contains said nucleic acid; vector that comprises said expression product; recombinant microorganism that is transformed with at least one said vector; said microorganism selected among bacteria of the genus *Escherichia*; method for preparing terminal or subterminal hydroxylated aliphatic carboxylic acids using said monooxygenase that is characterized by a functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby one amino acid substitution mutate must be F87V; said method which is characterized in that a C8-C30 monocarboxylic acid or a derivative thereof is used as a hydroxylatable carboxylic acid; said method which is characterized in that the reaction is carried out in the presence of an electron donor or reduction equivalent selected among NADH, NADPH and Zn/Co(III)sepulchrates.

9. Claims Nos. 3-5, 7-14, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K or F87V, L188K.

10. Claims Nos. 3-5, 7-14, 16, 17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K, A74G or F87V, L188K, A74G.

11. Claims Nos. 3-5, 7-17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K, A74G, R47F or F87V, L188K, A74G, R47F.

12. Claims Nos. 3-5, 7-17 (in part)

As in Invention No. 8, but limited to monooxygenases of *Bacillus megaterium* with an amino acid sequence in accordance with SEQ ID No. 2 and each containing at least one functional mutation in amino acid domains 86-88 and 172-224, whereby the monooxygenases have the amino acid substitution pattern F87A, L188K, A74G, R47F, V26T or F87V, L188K, A74G, R47F, V26T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2294692 A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		CN 1171818 A	28-01-1998
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		WO 9614419 A	17-05-1996
		JP 10503658 T	07-04-1998
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		PL 319970 A	01-09-1997
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		US 6100074 A	08-08-2000

WO 0031273 A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/53 C12N15/70 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/42 //(C12N1/21,C12R1:19)		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C12P		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MAVES SHELLEY A ET AL: "Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450-BM-3." FEBS LETTERS, Bd. 414, Nr. 2, 1997, Seiten 213-218, XP002155913 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--- -/--</div>	1-3, 7-12,16, 17
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
19. Dezember 2000	14. 03. 01	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter HORNIG H.	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 2, 1997, Seiten 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-3, 7-13,16, 17
X	--- TRUAN GILLES ET AL: "Thr268 in substrate binding and catalysis in P450BM-3." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 349, Nr. 1, 1. Januar 1998 (1998-01-01), Seiten 53-64, XP002155915 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument	1,2,7-11
X	--- YEOM HYEYONG ET AL: "The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450-BM-3." BIOCHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 45, 1995, Seiten 14733-14740, XP002155916 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1,2,7-11
X	--- KLEIN M L ET AL: "CRITICAL RESIDUES INVOLVED IN FMN BINDING AND CATALYTIC ACTIVITY IN CYTOCHROME P450BM-3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 268, Nr. 10, 5. April 1993 (1993-04-05), Seiten 7553-7561, XP000565661 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1,2,7-11
X	--- GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC) 8. Mai 1996 (1996-05-08) das ganze Dokument	1,2,7-11
	--- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHWANEBERG U ET AL: "P450 monooxygenase in biotechnology - I. Single-step, large-scale purification method for cytochrome P450 BM-3 by anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, Bd. 848, Nr. 1-2, 2. Juli 1999 (1999-07-02), Seiten 149-159, XP004172008 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument ---	
P,X	WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK () 2. Juni 2000 (2000-06-02) Ansprüche 1-20 -----	1-3,7-11

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Ansprüche 1, 2 komplett, 3, 6-13, 15-17 partiell.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: (1,2)-komplett, (3,6-13,15-17)-partiell

Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase, welche durch ortsspezifische Mutagenese ihres Substrat-bindenden Bereichs im Vergeleich zum Wildtyp ein verändertes Substratprofil bei der terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren zeigt; besagtes Enzym, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs; besagtes Enzym, abgeleitet von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, welches wenigstens in eine funktionelle Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224; und 352-356, mit der Massgabe, dass mehr als eine dieser Bereiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt; besagte Monooxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine einzelne V26T Aminosäuresubstitution aufweist; Nukleinsäure kodierend für besagte Monooxygenase; Expressionskonstrukt, enthaltend besagte Nukleinsäure; Vektor, umfassend besagtes Expressionsprodukt; Rekombinierter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem besagten Vektor; besagter Mikroorganismus, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*; Verfahren zur Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren mittels besagter Monooxygenase, gekennzeichnet durch eine einzelne V26T Aminosäuresubstitution; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C8-C30-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalent, ausgewählt unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat, durchführt.

2. Ansprüche: (3,6-13,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution R47F;

3. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution S72G;

4. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution A74G;

5. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution F87V;

6. Ansprüche: (3,6-13,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution L188Z, worin Z für eine Aminosäure, ausgewählt unter K, R, W, Q, N, G, A und S steht;

7. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution M354T;

8. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224; besagte Monooxygenase, gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresubstitutionsmutante F87V aufweist; Nukleinsäure kodierend für besagte Monooxygenase; Expressionskonstrukt, enthaltend besagte Nukleinsäure; Vektor, umfassend besagtes Expressionsprodukt; Rekombinierter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem besagten Vektor; besagter Mikroorganismus, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*; Verfahren zur Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren mittels besagter Monooxygenase, gekennzeichnet durch eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei eine Aminosäuresubstitutionsmutante F87V sein muss; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C8-C30-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalent, ausgewählt unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat, durchführt.

9. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K oder F87V, L188K aufweisen;

10. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G oder F87V, L188K, A74G aufweisen;

11. Ansprüche: (3-5,7-17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G, R47F oder F87V, L188K, A74G, R47F aufweisen;

12. Ansprüche: (3-5,7-17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G, R47F, V26T oder F87V, L188K, A74G, R47F, V26T aufweisen;

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07252

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2294692 A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		CN 1171818 A	28-01-1998
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		WO 9614419 A	17-05-1996
		JP 10503658 T	07-04-1998
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		PL 319970 A	01-09-1997
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		US 6100074 A	08-08-2000
WO 0031273 A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/40434-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 07252	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/1999
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 8 Blätter.

☐ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Ansprüche 1, 2 komplett, 3, 6-13, 15-17 partiell.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: (1,2)-komplett, (3,6-13,15-17)-partiell

Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase, welche durch ortsspezifische Mutagenese ihres Substrat-bindenden Bereichs im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Substratprofil bei der terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren zeigt; besagtes Enzym, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs; besagtes Enzym, abgeleitet von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.2, welches wenigstens in eine funktionelle Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224; und 352-356, mit der Massgabe, dass mehr als eine dieser Bereiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt; besagte Monooxygenase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine einzelne V26T Aminosäuresubstitution aufweist; Nukleinsäure kodierend für besagte Monooxygenase; Expressionskonstrukt, enthaltend besagte Nukleinsäure; Vektor, umfassend besagtes Expressionsprodukt; Rekombinierter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem besagten Vektor; besagter Mikroorganismus, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*; Verfahren zur Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren mittels besagter Monooxygenase, gekennzeichnet durch eine einzelne V26T Aminosäuresubstitution; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C8-C30-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalent, ausgewählt unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat, durchführt.

2. Ansprüche: (3,6-13,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution R47F;

3. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution S72G;

4. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution A74G;

5. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution F87V;

6. Ansprüche: (3,6-13,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution L188Z, worin Z für eine Aminosäure, ausgewählt unter K, R, W, Q, N, G, A und S steht;

7. Ansprüche: (3,6-13,15-17)-partiell

Idem wie Erfindung 1, aber beschränkt auf eine Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution M354T;

8. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

Monooxygenase von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224; besagte Monooxygenase, gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresubstitutionsmutante F87V aufweist; Nukleinsäure kodierend für besagte Monooxygenase; Expressionskonstrukt, enthaltend besagte Nukleinsäure; Vektor, umfassend besagtes Expressionsprodukt; Rekombinierter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem besagten Vektor; besagter Mikroorganismus, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*; Verfahren zur Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren mittels besagter Monooxygenase, gekennzeichnet durch eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei eine Aminosäuresubstitutionsmutante F87V sein muss; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C8-C30-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt; besagtes Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalent, ausgewählt unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat, durchführt.

9. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K oder F87V, L188K aufweisen;

10. Ansprüche: (3-5,7-14,16,17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G oder F87V, L188K, A74G aufweisen;

11. Ansprüche: (3-5,7-17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G, R47F oder F87V, L188K, A74G, R47F aufweisen;

12. Ansprüche: (3-5,7-17)-partiell

Idem wie Erfindung 8, aber beschränkt auf Monooxygenasen von *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID No.2, enthaltend wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäurebereichen 86-88 und 172-224, wobei die Monooxygenasen das Aminosäuresubstitutionsmuster F87A, L188K, A74G, R47F, V26T oder F87V, L188K, A74G, R47F, V26T aufweisen;

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSTANDES
IPK 7 C12N15/53 C12N15/70C12N9/02 C12N1/21
//(C12N1/21,C12R1:19)

C12P7/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MAVES SHELLEY A ET AL: "Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450-BM-3." FEBS LETTERS, Bd. 414, Nr. 2, 1997, Seiten 213-218, XP002155913 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument --- -/--	1-3, 7-12,16, 17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14.03.01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

HORNIG H.



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEKÜNDIGTE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GRAHAM-LORENCE SANDRA ET AL: "An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxxygenase." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 2, 1997, Seiten 1127-1135, XP002155914 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1-3, 7-13,16, 17
X	--- TRUAN GILLES ET AL: "Thr268 in substrate binding and catalysis in P450BM-3." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 349, Nr. 1, 1. Januar 1998 (1998-01-01), Seiten 53-64, XP002155915 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument	1,2,7-11
X	--- YEOM HYEYEONG ET AL: "The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450-BM-3." BIOCHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 45, 1995, Seiten 14733-14740, XP002155916 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1,2,7-11
X	--- KLEIN M L ET AL: "CRITICAL RESIDUES INVOLVED IN FMN BINDING AND CATALYTIC ACTIVITY INCYTOCHROME P450BM-3" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 268, Nr. 10, 5. April 1993 (1993-04-05), Seiten 7553-7561, XP000565661 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	1,2,7-11
X	--- GB 2 294 692 A (BRITISH GAS PLC) 8. Mai 1996 (1996-05-08) das ganze Dokument --- -/--	1,2,7-11

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHWANEBERG U ET AL: "P450 monooxygenase in biotechnology - I. Single-step, large-scale purification method for cytochrome P450 BM-3 by anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, Bd. 848, Nr. 1-2, 2. Juli 1999 (1999-07-02), Seiten 149-159, XP004172008 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument	
P,X	--- WO 00 31273 A (BELL STEPHEN GRAHAM ;CARMICHAEL ANGUS BISHOP (GB); WONG LUET LOK () 2. Juni 2000 (2000-06-02) Ansprüche 1-20 -----	1-3,7-11

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2294692 A	08-05-1996	AU 705736 B	03-06-1999
		AU 3811795 A	31-05-1996
		CN 1171818 A	28-01-1998
		CZ 9701277 A	15-10-1997
		EP 0789770 A	20-08-1997
		WO 9614419 A	17-05-1996
		JP 10503658 T	07-04-1998
		KR 234348 B	15-12-1999
		NZ 294904 A	24-09-1998
		PL 319970 A	01-09-1997
		RU 2133774 C	27-07-1999
		SK 54597 A	04-02-1998
		US 6100074 A	08-08-2000

WO 0031273 A	02-06-2000	AU 1281900 A	13-06-2000

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07574 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07252
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2000 (27.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 35 115.5 27. Juli 1999 (27.07.1999) DE
100 11 723.6 10. März 2000 (10.03.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESellschaft [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67056 Fussgönheim (DE); PLEISS, Juergen [DE/DE]; Ostlandstrasse 13, D-71679 Asperg (DE); SCHWANEBERG, Ulrich [DE/DE]; Uhlandstrasse 16, D-71336 Waiblingen (DE).
- (74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reistötter, Kinzebach & Partner, D-81679 München, Sternwartstrasse 4 (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, CN, JP, NO, US.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MODIFIED CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES

(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE CYTOCHROM P450-MONOOXYGENASEN

(57) Abstract: The invention relates to modified cytochrome P450 monooxygenases comprising a modified substrate profile, to nucleic acid sequences that code therefor, to expression constructs and vectors, and to recombinant microorganisms which contain these vectors. The invention also relates to methods for microbiologically producing terminally or subterminally hydroxylated aliphatic carboxylic acids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen, Expressionskonstrukte und Vektoren, rekombinante Mikroorganismen, welche diese Vektoren enthalten sowie Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung terminal oder subterminal hydroxylierter aliphatischer Carbonsäuren.

WO 01/07574 A2

Modifiziert Cytochrom P450-Monooxygenasen

Die vorliegende Erfindung betrifft modifizierte Cytochrom P450-Monooxygenasen mit verändertem Substratprofil, dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen, Expressionskonstrukte und Vektoren, rekombinante Mikroorganismen, welche diese Vektoren enthalten sowie Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung terminal oder subterminal hydroxylierter aliphatischer Carbonsäuren.

Die Monooxygenase mit der Bezeichnung P450 BM-3 ist ein Cytochrom P450-Enzym aus *Bacillus megaterium* und besitzt eine ausgeprägte Sequenzhomologie mit P450-Enzymen aus Säugern (1). Aufgrund dieser Übereinstimmungen stellt P450 BM-3 ein ausgezeichnetes Modellsystem für diese Klasse von P450-Enzymen dar. P450 BM-3 hydroxyliert in erster Linie langkettige gesättigte Fettsäuren an ihrem ω -1-, ω -2- und ω -3-Kohlenstoffatom. Amide oder Alkoholanaloga und Epoxide langkettiger ungesättigter Fettsäuren werden ebenfalls umgesetzt (1-3). Die katalytische Aktivität für gesättigte Fettsäuren ist abhängig von der Kettenlänge, wobei das Kettenlängen-Optimum bei 14 bis 16 Kohlenstoffatomen liegt. Das Enzym zeigt keine katalytische Aktivität für Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12 Kohlenstoffatomen (1).

25 Zusammenfassung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Cytochrom P450-Monooxygenase-Mutanten bereitzustellen, welche im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ein modifiziertes Substratprofil zeigen. Insbesondere sollten neue Mutanten bereitgestellt werden, welche gesättigte aliphatische Carbonsäuren in anderer Kettenposition hydroxylieren und/oder eine veränderte Substratspezifität besitzen. Vor allem sollten Mutanten bereitgestellt werden, welche katalytische Aktivität gegenüber aliphatischen Carbonsäuren mittlerer Kettenlänge, insbesondere mit einer Kettenlänge von 8 bis 12, wie z. B. 8 bis 10 Kohlenstoffatomen besitzen, und diese subterminal, vor allem an den Positionen ω -1, ω -2 und/oder ω -3 hydroxylieren.

Diese Aufgaben wurden überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung modifizierter Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche durch eine Kombination aus gerichteter Evolution und ortsspezifischer Mutagenese ihres Substrat-bindenden Bereichs im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Reaktivitätsmuster bzw. Substratprofil bei der terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren zeigen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Für erfindungsgemäße Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ein "verändertes Substratprofil" zu beobachten. Ein "verändertes Substratprofil" bedeutet in Rahmen der vorliegenden Erfindung a) eine Verbesserung der Reaktivität, wie z. B. eine Erhöhung der spezifischen Aktivität (ausgedrückt als nmol umgesetzte Carbonsäure/Minute/nmol P450-Enzym) und/oder wenigstens eines kinetischen Parameters, ausgewählt unter K_{cat} , K_m und K_{cat}/K_m , z.B. um mindestens 1 %, wie z. B. 10 bis 1000 %, 10 bis 500 %, oder 10 bis 100 %, der Mutante gegenüber zumindest einer hydroxylierbaren aliphatischen Carbonsäure oder einem hydroxylierbaren Derivat einer aliphatischen Carbonsäure und/oder b) eine Veränderung, insbesondere Erhöhung, der Regioselektivität bei der Carbonsäure-Hydroxylierung. So ist z.B. eine Verschiebung der bevorzugten terminalen oder subterminalen ($\omega-1$, $\omega-2$, $\omega-3$, $\omega-4$, insbesondere $\omega-1$ bis $\omega-3$) Hydroxylierungsposition an wenigstens einer hydroxylierbaren Carbonsäure oder einem hydroxylierbaren Derivat einer aliphatischen Carbonsäure. Hydroxylierbare aliphatische Carbonsäuren oder Derivate davon, bei denen erfindungsgemäß ein "verändertes Substratprofil" zu beobachten ist, sind verzweigte oder vorzugsweise geradkettige Carbonsäuren mit 8 bis 30 Kohlenstoffatomen. Die erfindungsgemäße Veränderung des Substratprofils kann dabei über den gesamten Größenbereich (d. h. C_8 - C_{30}) oder nur in Teilbereichen, z. B. bei C_8 - C_{12} -, C_{10} - C_{12} -, C_{12} - C_{30} -, C_{12} - C_{25} - oder C_{12} - C_{20} -Carbonsäuren oder bei einzelnen Carbonsäuren aus diesen Teilbereichen ausgeprägt sein.

Als nichtlimitierende Beispiele für erfindungsgemäß hydroxylierbare Carbonsäuren sind zu nennen: Capryl-, Pelargon-, Caprin-, Undecan-, Laurin-, Tridecan-, Myristin-, Pentadecan-, Palmitin-, Margaritin-, Stearin-, Nonadecan-, Arachin-, Behen-, Lignocerin-, Cerotin- und Melissinsäure. Beispiele für geeignete Carbonsäurederivate sind C_1 - C_4 -Alkylester, Amide oder Anhydride mit vorzugsweise kurzkettigen C_1 - C_4 -Carbonsäuren.

Die erfindungsgemäßen Monooxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen der Enzymklasse E.C. 1.14.--, insbesondere aus der P450-Familie CYP102, und sind eukaryotischen oder prokaryotischen, insbesondere bakteriellen Ursprungs.

Eine besonders bevorzugte Gruppe von Mutanten ist abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funktionale Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbereiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82 (helix 5), 86-88 (helix 6), 172-224 (F/G-loop) und 352-356 (β -strand 8), mit der Maß-

3

gabe, dass mehr als einer dieser Bereiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt; sowie funktionale Äquivalente dieser Mutanten.

5 Die jeweilige Mutation wird im Rahmen der vorliegenden Beschreibung im Aminosäure-Einbuchstabencode angegeben. Vor der Zahl, welche die Sequenzposition der Mutation bezeichnet, ist die ursprüngliche Aminosäure, nach der Zahl die modifizierte Aminosäure angegeben.

10

Eine "funktionale Mutation" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst einen Aminosäureaustausch in den genannten Sequenzbereichen, welcher zu einem "veränderten Reaktivitätsmuster" bzw. "veränderten Substratprofil" gemäß obiger Definition führt.

15

Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß P450 BM-3-Monooxygenase-Mutanten (Gruppe (A)), welche wenigstens je eine funktionale Mutation in den Aminosäuresequenzbereichen 86-88, 172-224, 73-82, 45-51 und 24-28 (gemäß SEQ ID NO: 2) einzeln oder in Kombination

20

umfassen.

So kann beispielsweise Phe87 ersetzt sein durch eine Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Ala, Val, Leu, insbesondere Val oder Ala; Leu188 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure

25 mit Amin- oder Amid-Seitenkette, wie z. B. Asn, Gln, Arg oder insbesondere Lys, oder Aminosäuren wie Ala, Gly, Ser und Trp; Ala74 kann ersetzt sein durch eine andere Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Val und insbesondere Gly; Arg47 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit ringförmiger Seiten-

30 gruppe, wie z.B. His, Tyr oder insbesondere Phe; und Val26 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit Hydroxyl-Seitengruppe, wie z.B. Ser oder insbesondere Thr.

Bevorzugte Gruppe (A)-Mutanten weist wenigstens eines der folgenden

35 den Aminosäuresubstitutionsmuster auf:

- a) F87V;
- b) F87A, L188K;
- c) F87V, L188K;
- 40 d) F87A, L188K; A74G;
- e) F87V, L188K, A74G;
- f) F87A, L188K, A74G, R47F;
- g) F87V, L188K, A74G, R47F;
- h) F87A, L188K, A74G, R47F, V26T; oder
- 45 i) F87V, L188K, A74G, R47F, V26T;

sowie funktionale Äquivalente davon.

Eine weitere Gruppe, Gruppe (B), geeigneter Mutanten weist eine einzelne Aminosäuresubstitution in einem der oben genannten Sequenzbereiche oder in einem der Sequenzbereiche 70-72 und 352-356 auf. In den beiden letztgenannten Sequenzbereichen kann beispielsweise Ser72 ersetzt sein durch eine Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette, wie z. B. Ala, Val, Leu, Ile und insbesondere Gly, und Met354 kann ersetzt sein durch eine Aminosäure mit Hydroxyl-Seitengruppe, wie z.B. Ser oder insbesondere Thr.

Insbesondere weisen Mutanten der Gruppe (B) eine der folgenden Aminosäuresubstitutionen auf:

- 15 a) V26T,
- b) R47F,
- c) S72G,
- d) A74G,
- e) F87V,
- 20 f) L188z, worin z für K, R, W, Q, N, G, A oder S steht, und
- g) M354T;

sowie funktionale Äquivalente davon.

25

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäuresubstitution aufweisen, aber trotzdem zu einer Mutante führen, die ebenso wie die konkret genannte Mutante ein gegenüber dem Wildtyp "verändertes Substratprofil" gemäß obiger Definition zeigen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Veränderungen im Reaktivitätsmuster qualitativ übereinstimmen.

35

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch P450-Monooxygenase-Mutanten, welche in gleicher Weise wie die konkret genannten P450 BM3-Mutanten durch Mutation von P450-Enzymen aus anderen Organismen zugänglich sind. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen. Mit den modernen Methoden des Molecular Modeling können dann in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente, das Reaktionsmuster beeinflussende Mutationen vorgenommen werden.

45 "Funktionale Äquivalente" umfassen ebenso die durch eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die ge-

5

nannten zusätzlichen Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit "verändertem Substratprofil" im obigen Sinne führen.

5 Gegenstand der Erfindung sind außerdem Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine mutierte Monooxygenase oder ein "funktionales Äquivalent" gemäß obiger Definition. Diese Sequenzen sind vorzugsweise von SEQ ID NO: 1 durch Austausch von Codons entsprechend der obigen Aminosäuresubstitutionsmuster erhältlich.

10

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind,

15 ebenso wie natürlich vorkommende Varianten davon. Erfindungsgemäß umfasst sind außerdem durch Degeneration des genetischen Codes (d. h. ohne Veränderung der korrespondierenden Aminosäuresequenz) oder konservative Nukleotidsubstitution (d. h. die korrespondierende Aminosäure wird durch eine andere Aminosäure gleicher

20 Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhaltene Abwandlungen der Nukleinsäuresequenzen, ebenso wie durch Nukleotidaddition, -insertion, -inversion oder -deletion veränderte Sequenzen, welche für eine erfindungsgemäße Monooxygenase mit "verändertem Substratprofil" kodieren, sowie die korrespondierenden

25 kompletären Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für eine erfindungsgemäße Mutante kodierende

30 Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor

35 und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente

40 seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale, Selektionsmarker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

45

6

Zusätzlich zu den artifiziell n Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression
5 der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mu-
10 tiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-,
15 lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder l-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4,
20 usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

25

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es
30 sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen
35 Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

40

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
45 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in

T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.
- 20 Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformierbar sind und zur Produktion der Mutanten eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.
- 35 Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

8

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out
5 Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z. B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch
10 Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine fargebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zell-
15 sortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z. B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert
20 werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ , μ oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen,
25 und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z. B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen
35 zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA zu programmieren.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur Herstellung
40 einer erfindungsgemäßen Monooxygenase, wobei man einen Monooxygenase-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert. Die erfindungsgemäße Monooxygenase kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies
45 erwünscht ist.

- Der Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.
- 10 Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und die Monooxygenase nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, 15 durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.
- 20 Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, 25 Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.
- 30 Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer 35 einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z. B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press).
- 40 Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden 45 kann.

10

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem biochemische Verfahren zur enzymatischen Herstellung von terminal oder subterminal (ω -1 bis ω -4) hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass man

- a1) einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in Gegenwart eines Kulturmediums, das wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat enthält, aerob kultiviert; oder
- a2) ein Reaktionsmedium, enthaltend wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat, mit einer erfindungsgemäßen Mutante aerob inkubiert; und
- b) das gebildete hydroxylierte Produkt oder Produktgemisch aus dem Medium isoliert.

25

Im erfindungsgemäßen Verfahren sind die Carbonsäuren per se, oder Derivate davon, wie insbesondere C_1 - C_4 -Alkylester oder Carbonsäureamide, einsetzbar.

Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren als hydroxylierbare Carbonsäure C_8 - C_{30} -Monocarbonsäuren oder Derivate davon eingesetzt.

Besonders bevorzugt verwendet man im erfindungsgemäßen Verfahren als hydroxylierbare Carbonsäure eine C_8 - C_{12} -Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante gemäß obiger Gruppe (A).

Gemäß einem anderen erfindungsgemäßen Verfahren verwendet man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C_{12} - C_{30} -Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante ausgewählt unter den Einfachmutanten F87A, F87V, V26T, S72G, A74G und M354T, und den Mehrfachmutanten f) bis i) gemäß obiger Gruppe (A) einsetzt.

Die erfindungsgemäße Oxidationsreaktion wird gewöhnlich in Gegenwart von Luftsauerstoff sowie in Gegenwart eines Elektronendonors (oder Reduktionsäquivalents), wie insbesondere NADH, NADPH und

11

Zn/Co(III)sepulchrat, durchgeführt. Die Verwendung von Zn/Co(III)sepulchrat ist beispielsweise in der DE-A-199 35 115 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

5

Wird die erfindungsgemäße Hydroxylierung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Die Zugabe von exogenem Substrat erfolgt je nach Bedarf. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren, insbesondere temperaturinduzierbaren, Promotors. Man erhöht dabei die Temperatur auf die erforderliche Induktionstemperatur, z.B. 42 °C beim P_{rP1} -Promotor, behält dies über einen ausreichenden Zeitraum, z. B. 1 bis 10 oder 5 bis 6 Stunden, zur Expression der Monooxygenase-Aktivität bei und verringert anschließend der Temperatur wieder einen Wert von etwa 30 bis 40 °C. Die Kultivierung wird dann in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt.

Wird die erfindungsgemäße Oxidation dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man die erfindungsgemäße Enzymmutante in einem exogenes Substrat enthaltenden Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50 °C, wie z.B. 30 bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 1-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten aufweisen kann. Die Zugabe des Reduktionsmittels kann falls erforderlich portionsweise erfolgen.

Falls erforderlich kann Sauerstoff in an sich bekannter Weise in das Reaktionsmedium eingeleitet werden.

Werden die erfindungsgemäßen Verfahren mit angereichertem oder gereinigtem Enzym durchgeführt, so kann man beispielsweise folgende Reaktionsbedingungen einstellen:

45 Substratkonzentration:	0,1 bis 20 mg/ml
Enzymkonzentration:	0,1 bis 10 mg/ml
Reaktionstemperatur:	20 bis 40 °C

12

- pH: 6 bis 8
Puffer: 0,05 bis 0,2 M Kaliumphosphat,
oder Tris/HCl
Elektronendonator: wird bevorzugt portionsweise zu-
gegeben (Anfangskonzentration
5 etwa 0,1 bis 2 mg/ml).

Vor dem Start der Reaktion durch Zugabe der Elektronendonors kann zur Aktivitätssteigerung Aceton in einer Konzentration von 1 bis
10 5 % (v/v) zugegeben und kurzzeitig (1 bis 5 Minuten) vorinkubiert werden (bei etwa 20 bis 40 °C).

Der Fachmann kann, abweichend davon, durch routinemäßige Versuche die jeweiligen Reaktionsbedingungen optimieren.

15

Zur Erzeugung von Varianten mit modifizierten enzymatischen Eigenschaften stehen im Rahmen des Protein-Engineerings zwei unterschiedliche Strategien zur Verfügung: zum einen die Methode des "rationalen Designs" (4) sowie die Methode der "gezielten Evolution" (5-7). Für ein erfolgreiches rationales Design ist ein
20 hochaufgelöstes dreidimensionales Strukturmodell sowie eine vertiefte Kenntnis des Enzymmechanismus von zentraler Bedeutung. Während für das rationale Design die Fähigkeit gezeigt wurde, Enzymmutanten zu erzeugen, welche hohe Aktivität gegenüber nicht-
25 natürlichen Substraten besitzen (4) ist der Effekt punktförmiger einzelner Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität, Aktivität und Spezifität der Mutanten häufig nicht vorhersagbar.

Obwohl Röntgenstrukturen von P450 BM-3 in der Protein-Data Bank
30 (8) hinterlegt wurden, ist die Konformation von Substrat und P450 während des kritischen Hydroxylierungsschrittes weiterhin unklar (9-11). Für die Methode der gezielten Evolution ist eine effiziente Nachweismethode für ein schnelles Screening großer Bibliotheken von Zufallsmutanten von zentraler Bedeutung. Ein optischer
35 Test für die P450 BM-3-Mutante F87A, welche ω -para-Nitrophenoxy-carbonsäuren (pNCA) verwendet, hat sich als brauchbar erwiesen (12, 13). Die Einzelmutante F87A verschiebt die Hydroxylierungsposition von Fettsäuren von der Position ω -1, ω -2 und ω -3 in Richtung der ω -Position (13) und führt außerdem zu einer voll-
40 ständigen Umwandlung von 12-pNCA im Vergleich zu einer 33 %igen Umwandlung, welche man für das Wildtyp-Enzym beobachtet (12). Da jedoch die Monooxygenase-Domäne von P450 BM-3 mehr als 400 Aminosäuren umfasst, kommt das Screening einer Bibliothek von Zufallsmutanten der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen gleich.

45

Zur Verbesserung der Effizienz der Suchprozedur wurde erfindungsgemäß das Verfahren des rationalen Designs mit dem Verfahren der gezielten Evolution kombiniert, um Mutanten mit modifizierter Reaktivität, insbesondere zur Erzeugung von Mutanten mit Spezifität für Fettsäuren mittlerer Kettenlänge, zu erzeugen. Die erfindungsgemäße Methode der "rationalen Evolution" basiert auf einem Computer-unterstützten Protein-Modeling, um eine virtuelle Zufalls-Bibliothek zu erzeugen und um Reste zu identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die gewünschten Eigenschaften beeinflussen. Eine Unter-Bibliothek wird durch Randomisierung dieser Reste erzeugt und auf positive Mutanten gescreent. Ausgehend von einem Strukturmodell beginnt man mit der Bestimmung von Resten, welche möglicherweise für die Kettenlängenspezifität von Bedeutung sind. Zur Erzeugung von Mutanten mit verbesserten Eigenschaften wird die durch das Modell vorgeschlagene Mutationsstelle mit Hilfe der Sättigungsmutagen modifiziert. Anschließend werden dann die Einzelmutanten mit den besten Eigenschaften unter Berücksichtigung des rationalen Designs miteinander kombiniert. Unter Anwendung dieser kombinierten Strategie konnte insbesondere die Aktivität von P450 BM-3 für Substrate mittlerer Kettenlänge verbessert werden.

Unter Anwendung dieser Strategie und aufgrund der Sequenzhomologie zu P450-Enzymen anderen Ursprungs wird es dem Fachmann ermöglicht in analoger Weise weitere Mutanten herzustellen, welche ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Die vorliegende Erfindung wird nun durch folgende experimentelle Beschreibung und unter Bezugnahme auf beiliegende Figuren näher erläutert. Dabei zeigt:

Figur 1 die schrittweise Optimierung von P450 BM-3 für das neue Substrat 8-pNCA. Die katalytische Effizienz gegenüber 8-pNCA ist für jede Mutante (in der Einheit $s^{-1}M^{-1}$) angegeben; und

Figur 2 ein Modell des Komplexes der P450 BM-3-Mutante LARVF mit dem Substrat 8-pNCA. Die Seitenketten, welche die fünf besten Mutationspositionen aufweisen und die zur Mutante LARVF kombiniert wurden, sind dargestellt (V26T, R47F, A74G, F87V, L188K).

40 Methode 1: Modellierung des Substrat-P450 BM-3-Komplexes

Die Modellierung des Substrat-Enzym-Komplexes basierte auf der kristallographisch bestimmten Struktur von P450 BM-3, komplexiert mit Palmitoleinsäure (9). Diese Struktur ist bei der Protein-Data Bank hinterlegt (8). Die beschriebene Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,9 Å enthält vier Moleküle in einer asymmetrischen

14

Einheitszelle. Kette A wurde als Referenz für den modellierten Komplex ausgewählt. Als Substratmolekül wurde ein Mod 11 von 8-pNCA unter Verwendung d s "Molecule Builder" von SYBYL (Tripos, Inc., St. Louis, USA) erzeugt. Die F87A-Mutation wurde unter Ver-
 5 wendung des Biopolymer-Tools von SYBYL erzeugt. Die C-Atome 1 bis 4 des Substrats wurden in die Bindungsstelle entsprechend den C-Atomen 6 bis 9 der gebundenen Palmitoleinsäure plaziert. Die Torsionswinkel der Fettsäurekette wurden entsprechend der Trans-Konfiguration gewählt. NMR-Untersuchungen für P450 BM-3-Laurat- und
 10 -12-Bromlaurat-Komplexe zeigten, dass die Protonen der hydroxylierten C-Atome (C10 und C11) etwa 3,0 Å vom Häm-Eisen in der Oxidationsstufe II entfernt sind (10, 13). Auf der Basis dieses Ergebnisses wurden die entsprechenden Atome C7 und C8 von 8-pNCA in einem Abstand von 4 Å bzw. 3,6 Å vom Häm-Eisen platziert. Die
 15 para-Nitrophenoxygruppe wurde manuell in der Bindungstasche angeordnet. Außerdem wurde die Energie des Komplexes über fixierte Backbone-Atome minimiert.

Methode 2: Sättigungsmutagenese

20

Die erfindungsgemäß verwendeten Mutanten wurden mit Hilfe der Sättigungsmutagenese unter Verwendung des Stratagene QuikChange Kit (La Jolla, Kalifornien, USA) hergestellt. Neun Positionen in der Umgebung des Substrat-Bindungskanal, und zwar P25, V26, R47,
 25 Y51, S72, A74, F87, L188 und M354, wurden für die Mutation über das P450 BM-3-Modeling ausgewählt. Die Primer für jede dieser Positionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1:

30

ausgewählte Positionen	Primer	Sequenz Nr.
P25	5'-gttattaaacacagataaannngttcaagctttgatg-3'	SEQ ID NO: 9
35	5'-catcaaagcttgaacnnntttatctgtgtttaataac-3'	SEQ ID NO: 10
V26	5'-gttattaaacacagataaaccgnnncaagctttgatg-3'	SEQ ID NO: 11
	5'-catcaaagcttgnnnccggtttatctgtgtttaataac-3'	SEQ ID NO: 12
R47	5'-cgaggcgcctggtnnngtaacgcgctacttattc-3'	SEQ ID NO: 13
	5'-gataagtagcgcgttacnnnaccaggcgcctcg-3'	SEQ ID NO: 14
40	Y51 5'-cctggtcgtgtaacgcgcnnnttatcaagtcagc-3'	SEQ ID NO: 15
	5'-gctgacttgataaannngcgcgttacacgaccagg-3'	SEQ ID NO: 16
S72	5'-gctttgataaaaacttannncaagcgcttaaatttgtagc-3'	SEQ ID NO: 17
	5'-cgtacaaatttaagcgcttgnnntaagtttttatcaaagc-3'	SEQ ID NO: 18
45	A74 5'-gctttgataaaaacttaagtcannncttaaatttgtagc-3'	SEQ ID NO: 7
	5'-cgtacaaatttaagnnttgacttaagtttttatcaaagc-3'	SEQ ID NO: 8
L188	5'-gaagcaatgaacaagnnncagcgagcaaattccag-3'	SEQ ID NO: 5
	5'-ctggatttgctcgctgnnncttgttcattgcttc-3'	SEQ ID NO: 6

M354	5'-ggcgacgaactannngttctgattcctcag-3'	SEQ ID NO: 19
	5'-ctgaggaatcagaacnnntagttcgtcgcc-3'	SEQ ID NO: 20
F87	5'-gcaggagacggggttgnnnacaagctggacg-3'	SEQ ID NO: 3
	5'-cgtccagcttgtnnncaaccccgctctcctgc-3'	SEQ ID NO: 4

- 5 Die Reaktionsbedingungen waren für alle mutagenen PCR-Verfahren identisch, mit Ausnahme der Annealing-Temperatur, welche in folgender Weise variiert wurde: 50 °C für die Positionen 25, 26, 188 und 354; 52 °C für die Positionen 47 und 51; und 46 °C für die Positionen 72, 74 und 87. Die Reaktionen wurden in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, wobei jeder Ansatz 17,5 pmol jedes Primers, 20 pmol der Template-Plasmid-DNA, 3 U der Pfu-Polymerase und 3,25 nmol jedes dNTP enthielt. Die Reaktion wurde bei 95 °C, 4 Minuten, gestartet, anschließend wurde 20-mal folgender Thermocyclus durchlaufen: 95 °C, 1 Min.; 46-52 °C, 2,5 Min.; 72 °C, 17 Min.; nach diesen 20 Cyclen wurde die Reaktion 15 Minuten bei 72 °C fortgesetzt. Für die ortsspezifische Mutagenese durch PCR wurde ein Einzelcodon für den Austausch einer Aminosäure verändert. Für die Randomisierung einer spezifischen Aminosäure wurden Primer verwendet, in denen "nnn" für die spezifische Aminosäure codiert. Alle PCR-Produktlösungen wurden mit 20 U DpnI bei 37 °C über 3 Stunden behandelt, um die ursprüngliche, nicht-mutierte Template-DNA zu verdauen. Anschließend erfolgte die Transformation in E. coli DH5α.

25 Methode 3: Expression und Reinigung von Wildtyp-Enzym sowie der Mutanten

- Das P450 BM-3-Wildtyp-Gen und dessen Mutanten wurden unter der Kontrolle des starken, Temperatur-induzierbaren P_{RPL} -Promotors pCYTEXP1 in E. coli Stamm DH5α (supe44, lacU169 [80lacZ M15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) exprimiert. Die einzelne Punktmutation F87A wurde, wie aus dem Stand der Technik bekannt (12), eingeführt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 100 µg/ml Ampicillin enthielten.
- 35 Nach 12- bis 24-stündigem Wachstum wurden die Kolonien mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen plazierte, wobei jede Vertiefung 200 µl TB-Medium (12 g Tryptophan, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, H₂O (dest.) ad. 1 Liter) mit 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 40 µl aus jeder Vertiefung entnommen und in Kulturröhrchen überführt, welche 2 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthielt, und anschließend wurde 2 Stunden bei 37 °C und dann 6 Stunden bei 42 °C inkubiert.
- 45 Die Zellen wurden bei 4000 Upm 5 Minuten abzentrifugiert, mit Lysozym aus Hühnereiweiß (1 U/ml) behandelt und dann zweimal gefroren und aufgetaut. Die Zell-Rohextrakte erhielt man durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 Upm. Der so erhaltene Überstand

16

- wurde für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Zur Herstellung großer Enzymmengen wurde ein 2 l-Schüttelkolben mit 300 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet, bei 37 °C inkubiert und 2 Stunden bei 200 Upm geschüttelt ($OD_{578nm} = 0,8$ bis 1,0) und anschließend 6 Stunden bei 42 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm gesammelt und in 15 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4 suspendiert. Die eisgekühlte Suspension wurde mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Deutschland) (80 W, 2 Minuten, 3 Cyclen) aufgeschlossen.
- 10 Die Suspension wurde 20 Minuten bei 32570 x g zentrifugiert. Die Rohextrakte wurden zur Bestimmung der Enzymaktivität oder zur Enzymreinigung verwendet.

- Die Enzymreinigung wurde wie in (14) beschrieben, durchgeführt, wobei jedoch eine BioPilot-Chromatographieanlage (Pharmacia, Schweden) verwendet wurde. Die Reinheit des Enzyms wurde durch Bestimmung des Gesamtproteins sowie der Menge des Enzyms festgestellt. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Differenz zwischen dem Extinktionsspektrum des Carbonylkomplexes der Eisen-(II)-form im Vergleich zur Eisen-(II)-form unter Verwendung einer molekularen Absorptivität von $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das Wellenlängenpaar 450 nm und 490 nm bestimmt (1).
- 20

Methode 4: Isolierung von Mutanten mit höherer Aktivität für Substrate kürzerer Kettenlänge

25

- Die Mutante F87A von P450 BM-3 wurde anstelle des Wildtyps als Template-DNA verwendet. Die Mutationen für die jeweilige Position wurden wie oben beschrieben hergestellt. Jeweils etwa 100 Kolonien wurden zur Durchmusterung des Sequenzraumes an jeder Position gepickt, in Kulturröhrchen kultiviert und Zellen wurden daraus isoliert und lysiert. Die Zell-Rohextrakte einer jeden ausgewählten Kolonie wurden für den Aktivitätstest verwendet. Sämtliche Mutanten, die im Vergleich zu F87A eine höhere Aktivität für wenigstens ein Substrat mit einer kürzeren Kettenlänge als 15-pNCA zeigten, wurden zur Bestimmung der Mutationen sequenziert.
- 30
- 35

- Die Mutante mit der jeweils höchsten Aktivität für 12-pNCA, 10-pNCA oder 8-pNCA von allen Mutanten für die gleiche Position wurde für eine spätere Kombination mit anderen Mutationen ausgewählt. Die kombinierte Mutation wurde schrittweise durch ortsspezifische Mutagenese ausgeführt. Der Kombinationsweg ist in Figur 1 dargestellt. Sechs Kolonien wurden für jeden Kombinations-
- 40
- 45
- schritt für die Bestimmung der Substratspezifität isoliert. Eine Kolonie mit repräsentativer Substratspezifität wurde ausgewählt und die Substratspezifität wurde für das reine Enzym bestimmt.

17

Das Plasmid der ausgewählten Kolonie wurde für den nächsten Schritt der ortsspezifischen Mutagenese verwendet. Die Mutationen in der Endmutante wurden durch DNA-Sequenzierung bestimmt (ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und 5 ABI Prism[™] 377 DNA Sequencer).

Methode 5: Enzym-Aktivitätstest

Für den pNCA-Aktivitätstest wurden 8 µl einer 10 mM pNCA-Lösung in DMSO in einer Einwegküvette in einem Endvolumen von 1 ml verwendet. Nach Zugabe von 850 µl Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,1 bis 0,4 nmol P450 zu der jeweiligen pNCA-DMSO-Lösung wurden die Proben 5 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer wässrigen Lösung von 1 mM NADPH gestartet wurde. Zur Bestimmung von K_{cat} und K_m wurde eine Konzentrationsreihe für die verschiedenen pNCA-Substrate erstellt (bezüglich Details des Nachweisverfahrens kann auf (12) verwiesen werden).

Zur Durchführung des pNCA-Tests in einer Mikrotiterplatte wurde eine Platte mit 96 Vertiefungen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 250 µl in Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) entweder 60 nmol 8-pNCA, 15 nmol 10-pNCA, 15 nmol 12-pNCA oder 15 nmol 15-pNCA, jeweils gelöst in 2,5 µl DMSO. Nach 5-minütiger Vorinkubation mit 40 µl P450 BM-3-Proben wurde die Reaktion durch Injektion von 30 µl einer 1 mM NADPH-Lösung in jede Vertiefung gestartet. Die Platten wurden unmittelbar nach Zugabe der NADPH-Lösung auf einem Platten-Lesegerät bei 405 nm vermessen.

30 Methode 6: Umsetzung von Carbonsäuren mit erfindungsgemäßen Mutanten und Bestimmung der Produkte

a) Chemische Reaktion

35 Für die Hydroxylierung der Fettsäuren in Anwesenheit von P450 BM-3 bzw. seiner Mutanten wurde folgender Ansatz gewählt:

P450 BM-3-Mutante	20 mg	
Reaktionspuffer	20 ml	(Tris/HCl 50mM, KCl 250mM, pH 7,8)
40 Fettsäure	10 mg	
Aceton	400 µl	(2 % v/v) (beschleunigt Reaktion um Faktor 2)

18

Das Enzymlyophilisat wurde vor der Reaktion in 1 ml Reaktionspuffer gelöst und zunächst 30 min bei 36 °C inkubiert. Die Inkubation führt wie die Zugabe von 2 Vol.-% Aceton zu einer Aktivitätssteigerung von 60 bzw. 75 %.

5

Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 500 µl der vorbereiteten NADPH-Lösung (12,5 mg/ml). Der Verlauf der Reaktion wurde durch Absorptionsmessungen bei 340 nm verfolgt, wobei der Verbrauch von NADPH beobachtet werden kann. Für eine stöchiometrische Umsetzung wären theoretisch 4 ml NADPH-Lösung notwendig,

10 trische Umsetzung wären theoretisch 4 ml NADPH-Lösung notwendig, eine zu hohe Konzentration an NADPH in der Reaktionslösung führt jedoch zur Inaktivierung des Enzyms, deshalb wird der Cofaktor in 500 µl-Schritten zugegeben.

15 Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 5M Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 2 angesäuert. Dabei fallen die Fettsäuren bzw. hydroxylierten Fettsäuren aus und führen zu einer sichtbaren Trübung der Lösung. Danach wurde zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der
20 Filtration über einen Faltenfilter erfolgte die Entfernung des Dichlormethans am Rotationsverdampfer oder durch Eindampfen mit Stickstoff. Der verbliebene weiße Feststoff wurde dann wieder in 2 ml Dichlormethan aufgenommen und für die GC-Analyse verwendet.

25 b) Gaschromatographische Analyse

Für die Analyse wurde ein Fisons Gaschromatograph (Fisons Instruments Mega Series, Mainz, Deutschland) mit FID verwendet (Optima 5-Säule, 25 m x 0,25 mm ID, Macherey & Nagel, Düren, Deutsch-
30 land).

Zur Analyse wurden Edukte und Produkte mit MSHFBA silyliert. Dabei werden alle Hydroxyl- und Säuregruppen in die entsprechenden Trimethylsilylether bzw. -ester umgewandelt. Dabei ist darauf zu
35 achten, dass die Probe wasserfrei ist, da es sonst zu Nebenreaktionen mit dem Silylierungsmittel kommt. Zu 10 µl der hydroxyfett-säurehaltigen Dichlormethan-Lösung wurden 15 µl MSHFBA pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl Dichlormethan erfolgte die GC-Analyse.

40

Dazu wurde 1 µl der silylierten Proben in den Gaschromatographen eingespritzt. Injektor- und Detektortemperatur lagen bei 350 °C. Folgende Temperaturprogramme wurden verwendet:

45

Caprylsäure

100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 200 °C $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

5 Caprinsäure

100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 140 °C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Laurinsäure

10 100 °C (2 min) $\xrightarrow{5^\circ/\text{min}}$ 170 °C (5 min) $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ 300 °C (5 min)

Beispiel 1: Selektion der Anfangsmutante

- 15 Die Einzelmutante F87A von P450 BM-3 wurde als Ausgangs-Template verwendet. Wie bereits erwähnt, wird durch diese Mutation die Hydroxylierungsposition in gesättigten C12- und C14-Fettsäuren von $\omega-1$, $\omega-2$ und $\omega-3$ in Richtung der ω -Position verschoben (13). Für die Umsetzung von 12-pNCA und 15-pNCA wurde ebenfalls gezeigt, dass die ω -Hydroxylierung im Vergleich zum Wildtyp signifikant verstärkt wird (12). Für die ω -Hydroxylierung von 12-pNCA erhielt man eine vollständige Umwandlung, verglichen mit einer 33 %igen Umwandlung für den Wildtyp. Zusätzlich zur erhöhten Regioselektivität beobachtete man auch erhöhte Aktivitäten für 12-pNCA und 15-pNCA (vergleiche Tabelle 2).

Tabelle 2: Spezifische Aktivität ausgewählter P450 BM-3-Mutanten für verschiedene pNCA-Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge¹

30	Substrat	WT	F87A	L188K	V26T	R47F	S72G	A74G	M354T
	15-pNCA	405	410	288	519	258	439	474	560
	12-pNCA	141	284	316	555	233	596	517	480
	10-pNCA	339	92	207	106	52	150	103	171
35	8-pNCA	15	2	69	16	13	3	6	4

¹ Einheiten spezifischer Aktivität: nmol/min/nmol P450

- Die erhöhte Regioselektivität von F87A ist anhand des Strukturmodells verständlich. Die Substitution des sperrigen Restes F87 durch Alanin vergrößert die Bindungstasche für die p-Nitrophenoxygruppe, welche durch F87, außerdem durch V78, A82, T260, I263 und A264 gebildet wird. Außerdem wird der Zugang der großen p-Nitrophenoxygruppe zur Bindungstasche erleichtert und die sterischen Wechselwirkungen zwischen F87 und den C-Atomen $\omega-2$ und $\omega-1$ der pNCA werden eliminiert. Dies ermöglicht eine vorteilhaftere Orientierung der ω -Position gegenüber dem Häm-Eisenatom.

20

Beispiel 2: Selektion einzelner Mutationspositionen durch Modell-
ling, ortsspezifische Randomisierungsmutagenese ausgewählter
Positionen und Screening

5 1. Selektion der Mutationspositionen

Das Modell des gebundenen C8-pNCA-Substrats zeigt, dass sich das Carboxylat in einem Abstand von 9 und 11 Å zu den Carboxylat-bindenden Resten R47 bzw. Y51 befindet. Um Aktivität gegenüber

10 C8-Substraten zu induzieren, ist es erforderlich, eine neue Bindungsstelle zu erzeugen, welche sich in geeigneter Distanz zur Carboxylatgruppe des Substrats befindet. Zur Erleichterung der Bindung von 8-pNCA sollten zusätzliche Reste innerhalb der Bindungsstelle positioniert werden. Folgende Reste wurden ausge-

15 wählt: Die Reste R47 und Y51, welche die ursprüngliche Carboxylat-Bindungsstelle bilden. Für R47 wird die Bildung eines Ionenpaares zwischen dessen Guanidiniumgruppe und dem Carboxylatrest des Substrats vorgeschlagen; Y51 bildet eine H-Brücke mit der Carboxylatgruppe des Substrats (9). Für den Palmitoleinsäure/P450

20 BM-3-Komplex beträgt die Distanz zwischen dem C α -Atom von R47 und dem C-Atom der Fettsäurecarboxylatgruppe 12 Å. Sämtliche Reste in der Hemisphäre mit einem 12 Å-Radius um die Carboxylatgruppe des 8-pNCA-Modells wurden bestimmt und nur solche innerhalb der Bindungstasche mit Seitenketten, die in Richtung der Carboxylat-

25 gruppe der Fettsäure weisen, wurden ausgewählt. So wurden P25, V26, S72, A74, L188 und M354 ausgewählt, welche wahrscheinlich eine neue Carboxylat-Bindungsstelle für kurzkettige pNCA-Verbindungen ausbilden könnten. Diese sechs ausgewählten Reste befinden sich auf sekundären Strukturelementen mit flexibler Konformation

30 (11).

2. Mutation und Screening

Mutanten von jedem der acht ausgewählten Reste wurden durch orts-

35 spezifische Randomisierung des Wildtyp-Codons an den entsprechenden Positionen erzeugt. Um sicherzustellen, dass die meisten der 19 möglichen Arten von Aminosäuren getestet werden, wurden 100 Kolonien einer jeden Position isoliert, kultiviert und auf Aktivität getestet. (Damit beträgt die Wahrscheinlichkeit, jede Ami-

40 nosäure zu testen, mehr als 95 %, ausgenommen einer Wahrscheinlichkeit von 79 % für Tryptophan und Methionin). Die Mutanten mit einem höheren Aktivitätswert für wenigstens ein Substrat mit kürzerer Kettenlänge als 15-pNCA wurden für die Sequenzierung zur Bestimmung der Mutation (Mutationen) ausgewählt.

Es zeigte sich, dass Position 188 relativ variabel ist. Die meisten der 100 Kolonien zeigten Aktivität für pNCA. Daraus wurden entsprechend ihrer Aktivität gegenüber 8-pNCA 37 Kolonien ausgewählt. 16 verschiedene Aminosäuretypen, einschließlich dem Wildtyp wurden detektiert. Dieses Ergebnis bestätigte außerdem, dass die Auswahl von 100 Kolonien ausreichend war, um sicherzustellen, dass die meisten der 20 möglichen Aminosäuren getestet werden können. Von den 15 Substitutionen erhöhten die Substitutionen K, R, W, Q, N, G, A und S signifikant die katalytische Aktivität für Substrate mit kürzerer Kettenlänge. Die Substitution von L durch negativ geladene Aminosäuren führte zu einer Verringerung der Aktivität gegenüber 10-pNCA, 12-pNCA und 15-pNCA um das Drei- bis Siebenfache.

- 15 Die anderen sieben Positionen wurden in ähnlicher Weise wie Position 188 randomisiert. Von jeder Position wurden 7 bis 19 Kolonien für die DNA-Sequenzierung zum Nachweis der Mutation (Mutationen) ausgewählt. Die meisten dieser Gene waren entweder nicht mutiert oder das Genprodukt zeigte eine verringerte Aktivität für Substrate kürzerer Kettenlänge (Tests wurden mit reinem Enzym durchgeführt). Jeweils nur eine Mutante der Positionen 26, 47, 74 und 354, zwei Mutanten der Position 72 und keine Mutante der Positionen P25 und Y51 zeigte im Vergleich zu 15-pNCA für Substrate kürzerer Kettenlänge eine höhere Aktivität. Die Mutante mit der höchsten Aktivität für 8-pNCA in Position 188 und Position 72 sowie sämtliche Einzelmutanten der Positionen 26, 47, 74 und 354 wurden für eine Kombination ausgewählt. Diese Mutationen, welche in obiger Tabelle 2 aufgelistet sind, enthalten folgende Substitutionen: V26T, R47F, S72G, A74G, L188K und M354T. Im Vergleich zu F87A erhöhte sich die spezifische Aktivität gegenüber 8-pNCA um den Faktor 0,5 bis 33,5. Jede dieser Mutationen wurde mit der Ursprungsmutation F87A schrittweise kombiniert.

Beispiel 3: Mehrfachmutanten, hergestellt durch schrittweise Kombination von Mutanten und deren Screening

1. Mutante L (F87A, L188K)

- Die Auswahl der ersten Mutante ist kritisch, da die Kombination von Einzelmutanten nicht notwendigerweise in einer Kumulation der Einzeleffekte resultiert. Eine falsche Auswahl der ersten Mutation könnte in die Richtung eines Evolutionsweges lenken, der nicht zu einer optimalen Mehrfachmutation führt. Im Falle eines großen Ausgangspools von Einzelmutanten ist daher eine enorme kombinatorische Vielfalt wahrscheinlich, und das Auffinden der gewünschten Mehrfachmutante ist folglich unwahrscheinlich.

22

Zwei Kriterien sprechen für die Auswahl der Mutante L als Ausgangspunkt: der n erhöhte Aktivität gegenüber 8-pNCA im Vergleich zu allen anderen Mutanten (Tabelle 2) sowie die Veränderungen in der Enzym-Substratwechselwirkung und den Eigenschaften der Bindungsstelle. Zur Verifizierung dieser Veränderungen wurden Strukturmodelle der ausgewählten Mutanten dadurch erzeugt, dass man die Seitenketten der Mutationspositionen mit Hilfe der SYBYL-Methode ersetzte. L188 ist am C-Terminus der α -Helix F lokalisiert. Diese Helix und die benachbarten G Helices erfahren die größte Verschiebung durch eine Substratbindung (9). Das Modell veranschaulicht, dass ein Austausch von Leucin durch Lysin zur Bildung einer neuen putativen Carboxylat-Bindungsstelle führt. Der Abstand zwischen der Aminogruppe von K188 und dem Carboxylatrest von 8-pNCA beträgt 6 Å und ist somit vergleichbar mit dem experimentell bestimmten Abstandswert für die Carboxylatgruppe der Palmitoleinsäure und der Guanidiniumgruppe von R47 (dem ursprünglichen Bindungsrest). Die Distanz zwischen der Guanidiniumgruppe von R47 und der Carboxylatgruppe von 8-pNCA beträgt 11,4 Å. Es kann daher vorgeschlagen werden, dass die Ionenpaar-Wechselwirkungen zwischen der Carboxylatgruppe des Substrates und K188 zusammen mit dem hydroxylierten C8-Atom in reaktiver Distanz zum Häm-Eisenatom erfolgen.

Die anderen fünf Mutanten wurden schrittweise mit der Mutante L durch ortsspezifische Mutagenese kombiniert (vergleiche Figur 1). Für jeden Mutagenese-Schritt wurde ein Strukturmodell der selektierten Mutanten erzeugt. Anhand dieses Modells wurden die Einflüsse der erzeugten Mutanten auf die Substratbindung untersucht und eine rationale Erklärung für die optimierten Eigenschaften der Mutanten und ihrer Kombinationen wurde davon ausgehend vorgeschlagen.

2. Mutante LA (F87A, L188K, A74G)

Die katalytische Effektivität gegenüber 8-pNCA erhöhte sich durch Einführung der Mutation A74G in die Mutante L. A74 befindet sich am N-Terminus der α -Helix B'. Da die Seitenkette von A74 sterisch mit der Aminogruppe von K188 interagiert, wird durch einen Austausch von A74 durch Glycin diese Wechselwirkung eliminiert, wodurch eine vorteilhaftere Orientierung der Seitenkette gegenüber der Carboxylatgruppe des Substrats ermöglicht wird.

3. Mutante LAR (F87A, L188K, A74G, R47F)

Die Verbesserung der katalytischen Effizienz für 8-pNCA gelang durch Einführung der zusätzlichen Mutation R47F. Die Mutation R47F hat zwei mögliche Effekte. Phenylalanin behindert die ur-

23

sprüngliche Carboxylatbindung und vergrößert den dem Lösungsmittel ausgesetzten hydrophoben Abschnitt am Eingang des Bindungskanals, der von den R sten F11, L14, L17, P18, P45 und A191 gebildet wird (vergleiche Figur 2). Dieser hydrophobe Abschnitt ist von besonderer Bedeutung für die Substratanbindung (11).

4. Mutante LARV (F87A, L188K, A74G, R47F, V26T)

Wird die Mutation M354T der Mutante LAR hinzugefügt, so verringert sich Kcat für 8-pNCA. M354T wurde deshalb aus weiteren Kombinations-Versuchen ausgeklammert. Fügt man jedoch die Mutation V26T der Mutante LAR zu, so zeigt die resultierende Mutante LARV einen geringfügig höheren Kcat-Wert und einen geringfügig geringeren Km-Wert als LAR. Die katalytische Effizienz gegenüber 8-pNCA erhöhte sich. Wird statt dessen die Mutation S72G in der Mutante LAR durchgeführt, so verringerte sich Kcat für 8-pNCA. Aus diesem Grund wurde die Mutante LARV für weitere Mutationen ausgewählt.

V26 ist am N-Terminus der α -Helix A lokalisiert. Das Modell weist darauf hin, dass T26 die Rolle des ursprünglichen Restes Y51 der Bindungsstelle übernehmen könnte und die Carboxylatgruppe des Substrates durch Ausbildung einer H-Brücke stabilisieren könnte. Der Abstand zwischen der Hydroxylgruppe von T26 und der Aminogruppe von K188 beträgt 6,9 Å. Verglichen mit der ursprünglichen Bindungsstelle ist dieser Abstand um etwa 2 Å größer (4,8 Å zwischen der Hydroxygruppe von Y51 und der Guanidiniumgruppe von R47). Es besteht somit die Möglichkeit, dass die K188-haltige F-Helix weiteren Konformations-Änderungen unterzogen wird, aufgrund derer 8-pNCA tiefer in der Bindungsregion festgehalten wird und die Distanz zwischen T26 und K188 verringert wird.

5. Mutante LARVF (F87V, L188K, A74G, R47F, V26T)

Es konnte gezeigt werden, dass Position 87 von besonderer Bedeutung für die katalytische Aktivität und die Substratspezifität des Enzyms ist (3, 13). Die Mutante LARV wurde deshalb in Position 87 durch ortsspezifische randomisierte Mutagenese optimiert. Von 100 Kolonien wurde eine Mutante erhalten, welche eine katalytische Effizienz von $3,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ gegenüber 8-pNCA zeigte. Die DNA-Sequenzdaten ergaben, dass Alanin in Position 87 durch Valin ersetzt war.

Aus der Kristallstruktur (11) und früheren Experimenten (3, 13) ist bekannt, dass R87 wichtig für den Zugang des Substrates zum Häm-Eisen ist. Die sperrige para-Nitrophenylgruppe dieses Substrats machte es notwendig, die Größe der Bindungsstelle durch

24

den Austausch von Ph nylalanin durch Alanin zu erhöhen. Durch den Austausch von A87 durch Valin wird der Kontakt von C_ω mit dem Häm-Eisenatom aufgrund sterischer Wechselwirkungen zwischen dem Ethersauerstoff und der Seitenkette von V87 verbessert.

5

Die Daten zeigen, dass zwei Schlüsselschritte, F87A zu L und LARV zu LARVF, die katalytische Effizienz gegenüber 8-pNCA erhöhten. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die anderen Mutationen in der Mutante LARVF wieder rückgängig gemacht werden können, ohne die Aktivität für 8-pNCA zu verlieren. Deshalb wurden Mutanten hergestellt, die statt der Mutation F87A die Mutation F87V enthalten. Diese Mutanten tragen folgende Bezeichnungen:

- 1.) L7V mit den Mutationen F87V L188K
- 15 2.) AL7V mit den Mutationen F87V L188K A74G
- 3.) ARL7V mit den Mutationen F87V L188K A74G R47F

Bei den Aktivitätstests wurden folgende Ergebnisse erhalten:

20 Tabelle 3: Kinetische Parameter von P450 BM-3-Mutanten für pNCA-Derivate unterschiedlicher Kettenlänge, ermittelt bei pH 8,0 und 25 °C

	Kcat (s ⁻¹)			Km (μM)			Kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)		
	12	10	8	12	10	8	12	10	8
25 F87V	0,7	1,8	-	3,8	8,5	-	1,7·10 ⁵	2,1·10 ⁵	-
L7V	2,8	4,7	-	6,4	14,2	-	4,3·10 ⁵	3,3·10 ⁵	-
AL7V	2,2	5,9	4,3	15,1	22,7	197,6	1,4·10 ⁵	2,6·10 ⁵	2,0·10 ⁴
30 ARL7V	1,4	5,5	3,9	8,9	17,5	41,4	1,7·10 ⁵	3,1·10 ⁵	9,3·10 ⁴
ARVLF	1,4	7,2	0,2	12,3	44,8	6,5	9,2·10 ⁴	1,6·10 ⁵	3,5·10 ⁴

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutanten F87V und L7V für das Substrat 8-pNCA keinen messbaren Umsatz zeigen. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Vierfachmutante ARL7V eine noch bessere katalytische Effizienz aufweist als die Fünffachmutante ARVLF.

Die Mutanten ARL7V und ARVLF zeigen weiterhin hohe Aktivitäten für Caprinsäure (C10), die um zwei Kohlenstoffatome kürzer ist als das native kürzeste Fettsäure-Substrat des Wildtyp-Enzyms. Außerdem wurden ω-4-monohydroxylierte Produkte beobachtet, wenn Laurinsäure (C12) als Substrat verwendet wird, wohingegen das Wildtyp-Enzym von P450 BM-3 nur in den Positionen ω-1, ω-2 und ω-3 aktiv ist.

25

Beispiel 4: Bestimmung der bevorzugten Hydroxylierungsposition für Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und verschiedene Mutanten und Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym

5 Die Reaktionsansätze werden gemäß oben b beschriebener Methode 6 aufgearbeitet und analysiert.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 4 zusammengefasst.

10 Tabelle 4:

	Hydroxylierungspositionen	Caprinsäure (C10) [%]	Laurinsäure (C12) [%]
	Wildtyp		
15	ω -3	-	34
	ω -2	-	28
	ω -1	-	38
	Mutante L7V		
20	ω -3	-	53
	ω -2	-	30
	ω -1	-	17
	Mutante F87V		
25	ω -3	-	51
	ω -2	-	25
	ω -1	-	24
	Mutante AL7V		
30	ω -3	-	28
	ω -2	-	54
	ω -1	-	18
	Mutante ARL7V		
35	ω -3	14	35
	ω -2	33	50
	ω -1	53	15
	Mutante ARVLF		
40	ω -3	15	34
	ω -2	30	53
	ω -1	55	13

Auffallend bei der Hydroxylierung von Laurinsäure ist zunächst ein Wechsel der Regioselektivität beim Übergang vom Wildtyp zu 45 P450 BM-3 F87V, das eine ω -3-Hydroxylierung bevorzugt katalysiert, ebenso wie P450 BM-3 L7V. Beim Übergang zur Dreifachmutante ändert sich die Regioselektivität erneut, P450 BM-3 AL7V,

26

P450 BM-3 ARL7V und P450 BM-3 ARVLF dirigieren die Hydroxylierung bevorzugt in die ω -2-Position.

Alle GC-Analysen zeigen, dass Caprinsäure nur von P450 BM-3 ARVLF
5 und P450 BM-3 ARL7V umges tzt wird, bei den anderen Mutanten wurde ein Umsatz unter 1 % festgestellt. Beide Enzyme weisen fast identische Regioselektivität, mit der Bevorzugung ω -1-Position auf.

- 10 Zur Bestimmung der Reaktionsausbeuten wurden Gaschromatogramme von Standards aufgenommen. Als Eduktstandard fand eine Caprinsäure- bzw. Laurinsäurelösung mit Dichlormethan als Lösungsmittel (Konzentration 0,5 mg/ml) Verwendung. Aufgrund der FID-Detektionsmethode können die Peakflächen von Edukt und Produkten nicht
15 einfach zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, da Moleküle unterschiedlicher Struktur- und Summenformel bei der Verbrennung unterschiedliche Ionenströme erzeugen. Diese Ionenströme sind nicht proportional zum Stoffmengenverhältnis von Edukt und Produkten. Als Produktstandard wurde deshalb käuflich erwerbbarer
20 10-Hydroxycaprinsäure bzw. 12-Hydroxylaurinsäure verwendet. Die Summenformeln der Standards und der Produkte sind gleich, und die Struktur unterscheidet sich nur in der Stellung der Hydroxylgruppe, weshalb bei gleichen Stoffmengen annähernd von gleichen detektierbaren Ionenströmen ausgegangen wird.

25

Bei den Hydroxylierungen von Caprinsäure mit P450 BM-3 ARVLF und P450 BM-3 ARL7V-Katalyse betrugen die kumulierten Ausbeuten an Produkt 57 % bzw. 38 %. Bei den Hydroxylierungen von Laurinsäure betrug die Ausbeute bei P450 BM-3 ARVLF-Katalyse 51 %, bei allen
30 anderen Mutanten und dem Wildtyp zwischen 38 % und 40 %.

35

40

45

Literatur

1. Boddupalli, S. S., et al., (1990) J. Biol. Chem. 265, 4233-4239
- 5 2. Capdevila, J. H., et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 22663-22671
3. Graham-Lorence, S., et al., (1997) J. Biol. Chem. 272, 1127-1135
- 10 4. Cleland, J. L. und Craik, C. S., Eds. (1996) Protein Engineering: Principles and Practice, Wiley-Liss, New York
- 15 5. Kuchner, O. und Arnold, F. H., (1997) Trends Biotechnol. 15, 523-530
6. Stemmer, W. P.C. (1994) Nature (London) 370, 389-391
- 20 7. Bornscheuer, U. T., (1998) Angew. Chem 110, 3285-3288
8. Bernstein, F. C., et al., (1977) J. Mol. Biol. 112, 525-542
9. Li, H. und Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol. 4, 140-146
- 25 10. Modi, S., et al., (1996) Nat. Structural Biol. 3, 414-417
11. Ravichandran, K. G., et al., (1993) Science 261, 731-736
- 30 12. Schwaneberg, U., et al., (1999) Anal. Biochem. 269, 359-366
13. Oliver, C.F., et al., (1997) Biochemistry, 36, 1567-1572
- 35 14. Schwaneberg, U., et al., J. Chromatography A, in press
15. Cherry, J. R., et al., (1999) Nature Biotechnology, 17, 379-384

Patentansprüche

1. Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase, welche durch orts-
spezifische Mutagenese ihres Substrat-bindenden Bereichs im
Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Substratprofil bei der
terminalen und/oder subterminalen enzymatischen Hydroxylierung
von aliphatischen Carbonsäuren zeigt.
2. Monooxygenase nach Anspruch 1, abgeleitet von Cytochrom P450
Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
3. Monooxygenase nach Anspruch 2, abgeleitet von Cytochrom P450
Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Amino-
säuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funk-
tionale Mutation in einem der folgenden Aminosäuresequenzbe-
reiche aufweist: 24-28, 45-51, 70-72, 73-82, 86-88, 172-224
und 352-356, mit der Maßgabe, dass mehr als einer dieser Be-
reiche mutiert ist, wenn das Enzym die Mutation F87A trägt.
4. Monooxygenase nach Anspruch 3, enthaltend wenigstens je eine
funktionale Mutation in den Aminosäuresequenzbereichen 86-88
und 172-224.
5. Monooxygenase nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass
sie wenigstens eines der folgenden Aminosäuresubstitutionsmu-
ster aufweist:
- a) F87V;
 - b) F87A L188K;
 - c) F87V L188K;
 - d) F87A L188K A74G;
 - e) F87V L188K A74G;
 - f) F87A L188K A74G R47F;
 - g) F87V L188K A74G R47F;
 - h) F87A L188K A74G R47F V26T; oder
 - i) F87V L188K A74G R47F V26T;
- sowie funktionale Äquivalente davon.
6. Monooxygenase nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass
sie eine einzelne der folgenden Aminosäuresubstitutionen
aufweist:
- a) V26T,
 - b) R47F,
 - c) S72G,

- d) A74G,
e) F87V,
f) L188z, worin z für eine Aminosäure, ausgewählt unter K, R, W, Q, N, G, A und S steht; und
5 g) M354T;

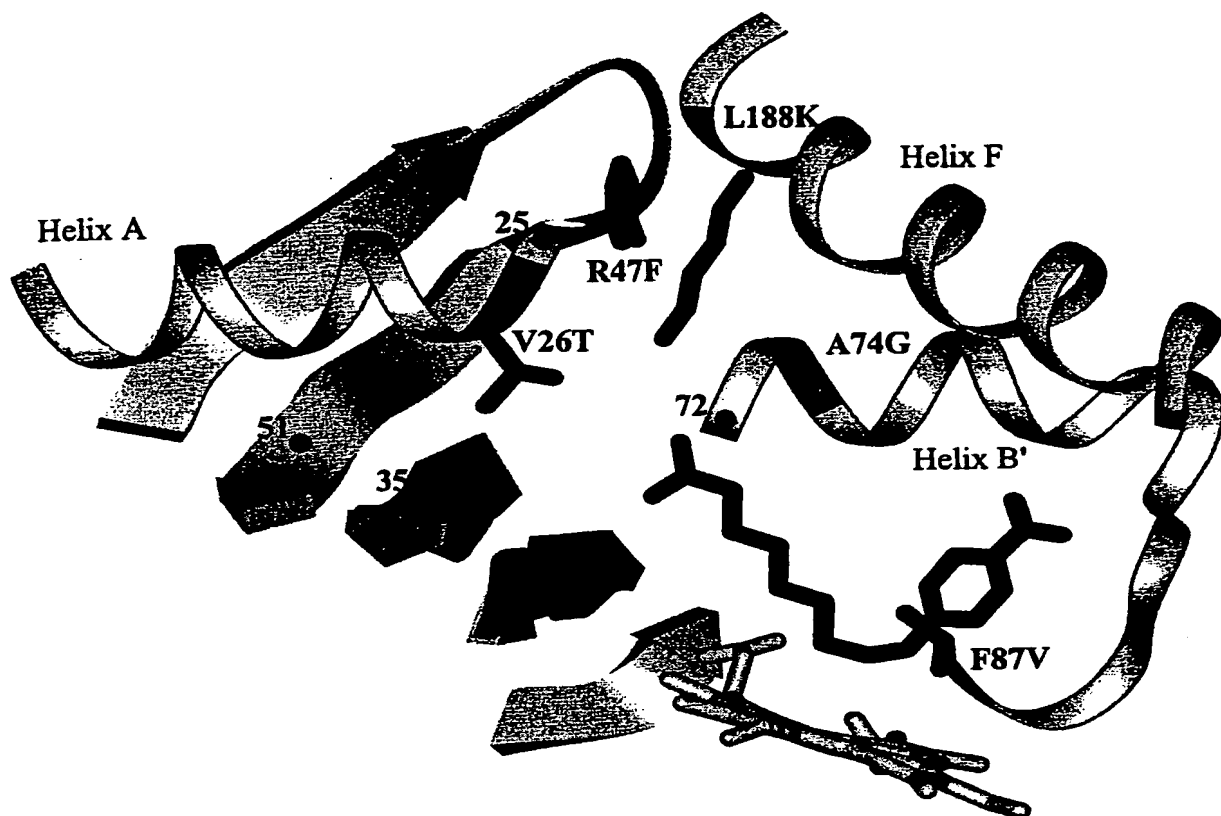
sowie funktionale Äquivalente davon.

7. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Monooxygenase nach einem der vorherigen Ansprüche und deren komplementäre Nukleinsäuresequenz.
10
8. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 7 umfasst.
15
9. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt nach Anspruch 8.
20
10. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 9.
11. Mikroorganismus nach Anspruch 10, ausgewählt unter Bakterien der Gattung Escherichia.
25
12. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass man
30
- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 10 oder 11 in Gegenwart eines Kulturmediums das die wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat kultiviert; oder
35
- a2) ein Reaktionsmedium, enthaltend wenigstens eine hydroxylierbare Carbonsäure oder wenigstens ein hydroxylierbares Carbonsäurederivat, mit einem Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 6 inkubiert; und
40
- b) das gebildete hydroxylierte Produkt aus dem Medium isoliert.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C₈-C₃₀-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon einsetzt.
45

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C₈-C₁₂-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante gemäß Anspruch 5 einsetzt.
- 5
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man als hydroxylierbare Carbonsäure eine C₁₂-C₃₀-Monocarbonsäure oder ein Derivat davon und als Monooxygenase eine Mutante ausgewählt unter den Einfachmutanten F87A, F87V, V26T, S72G, A74G und M354T, und den Mehrfachmutanten
- 10 F87A L188K A74G R47F;
F87V L188K A74G R47F;
F87A L188K A74G R47F V26T; oder
F87V L188K A74G R47F V26T;
- 15 einsetzt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion in Gegenwart eines Elektronendonors oder Reduktionsäquivalents durchführt.
- 20
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Elektronendonator oder das Reduktionsäquivalent ausgewählt ist unter NADH, NADPH und Zn/Co(III)sepulchrat.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45



Fig. 1

**Fig.2**

53 Rec'd PCT/PTC 23 JAN 200

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/40434

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3150

<212> DNA

<213> Bacillus megaterium

<220>

<221> CDS

<222> (4)...(3150)

<400> 1

atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa	48
Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys	
1 5 10 15	
aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa	96
Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys	
20 25 30	
att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt	144
Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg	
35 40 45	
gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat	192
Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp	
50 55 60	
gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt	240
Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg	
65 70 75	

gat ttt gca gga gac ggg tta ttt aca agc tgg acg cat gaa aaa aat 288
Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn
80 85 90 95
tgg aaa aaa gcg cat aat atc tta ctt cca agc ttc agt cag cag gca 336
Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala
100 105 110
atg aaa ggc tat cat gcg atg atg gtc gat atc gcc gtg cag ctt gtt 384
Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val
115 120 125
caa aag tgg gag cgt cta aat gca gat gag cat att gaa gta ccg gaa 432
Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu
130 135 140
gac atg aca cgt tta acg ctt gat aca att ggt ctt tgc ggc ttt aac 480
Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn
145 150 155
tat cgc ttt aac agc ttt tac cga gat cag cct cat cca ttt att aca 528
Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr
160 165 170 175
agt atg gtc cgt gca ctg gat gaa gca atg aac aag ctg cag cga gca 576
Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala
180 185 190
aat cca gac gac cca gct tat gat gaa aac aag cgc cag ttt caa gaa 624
Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu
195 200 205
gat atc aag gtg atg aac gac cta gta gat aaa att att gca gat cgc 672
Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg
210 215 220
aaa gca agc ggt gaa caa agc gat gat tta tta acg cat atg cta aac 720
Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn
225 230 235
gga aaa gat cca gaa acg ggt gag ccg ctt gat gac gag aac att cgc 768

Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg
 240 245 250 255
 tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt 816
 Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly
 260 265 270
 ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta gtg aaa aat cca cat gta tta 864
 Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu
 275 280 285
 caa aaa gca gca gaa gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca 912
 Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro
 290 295 300
 agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac 960
 Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn
 305 310 315
 gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca 1008
 Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala
 320 325 330 335
 aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac 1056
 Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp
 340 345 350
 gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg 1104
 Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp
 355 360 365
 gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt 1152
 Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser
 370 375 380
 gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg 1200
 Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala
 385 390 395
 tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt 1248
 Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly

-4-

400	405	410	415	
atg atg cta aaa cac ttt gac ttt gaa gat cat aca aac tac gag ctg				1296
Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu L u				
	420	425	430	
gat att aaa gaa act tta acg tta aaa cct gaa ggc ttt gtg gta aaa				1344
Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys				
	435	440	445	
gca aaa tcg aaa aaa att ccg ctt ggc ggt att cct tca cct agc act				1392
Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr				
	450	455	460	
gaa cag tct gct aaa aaa gta cgc aaa aag gca gaa aac gct cat aat				1440
Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn				
	465	470	475	
acg ccg ctg ctt gtg cta tac ggt tca aat atg gga aca gct gaa gga				1488
Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly				
	480	485	490	495
acg gcg cgt gat tta gca gat att gca atg agc aaa gga ttt gca ccg				1536
Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro				
	500	505	510	
cag gtc gca acg ctt gat tca cac gcc gga aat ctt ccg cgc gaa gga				1584
Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly				
	515	520	525	
gct gta tta att gta acg gcg tct tat aac ggt cat ccg cct gat aac				1632
Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn				
	530	535	540	
gca aag caa ttt gtc gac tgg tta gac caa gcg tct gct gat gaa gta				1680
Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val				
	545	550	555	
aaa ggc gtt cgc tac tcc gta ttt gga tgc ggc gat aaa aac tgg gct				1728
Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala				
	560	565	570	575

act acg tat caa aaa gtg cct gct ttt atc gat gaa acg ctt gcc gct 1776
 Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala
 580 585 590
 aaa ggg gca gaa aac atc gct gac cgc ggt gaa gca gat gca agc gac 1824
 Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp
 595 600 605
 gac ttt gaa ggc aca tat gaa gaa tgg cgt gaa cat atg tgg agt gac 1872
 Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp
 610 615 620
 gta gca gcc tac ttt aac ctc gac att gaa aac agt gaa gat aat aaa 1920
 Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys
 625 630 635
 tct act ctt tca ctt caa ttt gtc gac agc gcc gcg gat atg ccg ctt 1968
 Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu
 640 645 650 655
 gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa 2016
 Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu
 660 665 670
 ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa 2064
 Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu
 675 680 685
 ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att 2112
 Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile
 690 695 700
 cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc 2160
 Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly
 705 710 715
 cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta 2208
 Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu
 720 725 730 735
 gct cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa 2256

-6-

Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln
740 745 750
tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg cag ctt cgc gca atg 2304
Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met
755 760 765
gct gct aaa acg gtc tgc ccg ccg cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg 2352
Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu
770 775 780
ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca 2400
Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr
785 790 795
atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgt gaa atg aaa ttc agc 2448
Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser
800 805 810 815
gaa ttt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att 2496
Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile
820 825 830
tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc 2544
Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser
835 840 845
gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att 2592
Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile
850 855 860
gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc 2640
Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys
865 870 875
ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa 2688
Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu
880 885 890 895
acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga 2736
Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg

900	905	910	
ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt			2784
Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu			
915	920	925	
gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat			2832
Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr			
930	935	940	
ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg			2880
Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr			
945	950	955	
ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt			2928
Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val			
960	965	970	975
cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat			2976
Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp			
980	985	990	
caa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct			3024
Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro			
995	1000	1005	
gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg			3072
Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val			
1010	1015	1020	
agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc			3120
Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly			
1025	1030	1035	
cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa			3150
Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly			
1040	1045		

<210> 2

<211> 1048

<212> PRT

-8-

<213> Bacillus megaterium

<400> 2

Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile
 20 25 30
 Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val
 35 40 45
 Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu
 50 55 60
 Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp
 65 70 75 80
 Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp
 85 90 95
 Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met
 100 105 110
 Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln
 115 120 125
 Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp
 130 135 140
 Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn Tyr
 145 150 155 160
 Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser
 165 170 175
 Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn
 180 185 190
 Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp
 195 200 205
 Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys
 210 215 220
 Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly

-9-

225	230	235	240
Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr			
245	250	255	
Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu			
260	265	270	
Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln			
275	280	285	
Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser			
290	295	300	
Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu			
305	310	315	320
Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys			
325	330	335	
Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu			
340	345	350	
Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly			
355	360	365	
Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala			
370	375	380	
Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys			
385	390	395	400
Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met			
405	410	415	
Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp			
420	425	430	
Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala			
435	440	445	
Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr Glu			
450	455	460	
Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn Thr			
465	470	475	480

-10-

Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly Thr
 485 490 495
 Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro Gln
 500 505 510
 Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly Ala
 515 520 525
 Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn Ala
 530 535 540
 Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val Lys
 545 550 555 560
 Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala Thr
 565 570 575
 Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala Lys
 580 585 590
 Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp Asp
 595 600 605
 Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp Val
 610 615 620
 Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys Ser
 625 630 635 640
 Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu Ala
 645 650 655
 Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu Leu
 660 665 670
 Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu Leu
 675 680 685
 Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile Pro
 690 695 700
 Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly Leu
 705 710 715 720
 Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu Ala

-11-

725	730	735	
His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln Tyr			
740	745	750	
Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met Ala			
755	760	765	
Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu Leu			
770	775	780	
Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr Met			
785	790	795	800
Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser Glu			
805	810	815	
Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser			
820	825	830	
Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser Val			
835	840	845	
Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile Ala			
850	855	860	
Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys Phe			
865	870	875	880
Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu Thr			
885	890	895	
Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg Gly			
900	905	910	
Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu Gly			
915	920	925	
Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr Leu			
930	935	940	
Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr Leu			
945	950	955	960
His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val Gln			
965	970	975	

-12-

His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp Gln

980

985

990

Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro Ala

995

1000

1005

Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val Ser

1010

1015

1020

Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly Arg

025

1030

1035

1040

Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly

1045

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 3

gcaggagacg gggtggnnac aagctggacg

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 4

cgtccagctt gtanncaacc cgtctcctgc

30

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

-13-

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 5

gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaat ccag

34

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 6

ctggatttgc tcgctgnnnc ttgttcattg cttc

34

<210> 7

<211> 41

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 7

gctttgataa aaacttaaag tcaannnctt aaatttgtac g

41

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 8

cgtacaaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc

40

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

-14-

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 9

gttattaaac acagataaan nngttcaagc ttgatg

37

<210> 10

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 10

catcaaagct tgaacnnntt tatctgtgtt taataac

37

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 11

gttattaaac acagataaac cgnnncaagc ttgatg

37

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 12

catcaaagct tgnnncggtt tatctgtgtt taataac

37

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 13

cgaggcgcct ggtnnngtaa cgcgctactt atc

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 14

gataagtagc gcgttacnnn accagggccc tcg

33

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 15

cctggtcgtg taacgcgcnn nttatcaagt cagc

34

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 16

gctgacttga taannngcgc gttacacgac cagg

34

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 17

gctttgataa aaacttannn caagcgctta aattgtacg

40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 18

cgtacaaatt taagcgcttg nnntaagttt ttatcaaagc

40

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 19

ggcgacgaac tannngttct gattcctcag

30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 20

ctgaggaatc agaacnnnta gttcgctcgcc

30

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M/40434-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/07252	International filing date (day/month/year) 27 July 2000 (27.07.00)	Priority date (day/month/year) 27 July 1999 (27.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/53, 15/70, 9/02, 1/21, C12P 7/42, C12N 1/21		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input checked="" type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 February 2001 (22.02.01)	Date of completion of this report 07 November 2001 (07.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-27 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-17 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/2-2/2 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages _____ 1-16 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 3-17 (in part).

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 3-17 (in part).

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	6, 15	YES
	Claims	1-3, 7-13, 16, 17	NO
Inventive step (IS)	Claims	6, 15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3, 6-13, 15-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Citations

D1: Maves et al. (1997) FEBS Letters 414: 213-218

2. Novelty and inventive step

The present application concerns modified cytochrome P450 monooxygenases, in particular from *Bacillus megaterium*, that show a substrate profile modified by mutations in their substrate-binding region, in comparison with their wild type, nucleic acid sequences that encode them and expression constructs, vectors and recombinant micro-organisms based thereon. Moreover, a method is described for the enzymatic production of terminally or subterminally hydroxylated aliphatic carboxylic acids in which such a modified cytochrome P450 or recombinant micro-organism is used.

D1 describes a cytochrome P450 mutant from *B. megaterium* in which Pro-25 was mutated to Glu. Tests in which substrates were converted by means of the mutant show a modified substrate profile and modified hydroxylation specificity (preferred

hydroxylation of the ω -3 position by the mutant).

Claims 1-3 and 7-11, which concern the modified cytochrome P450 monooxygenase mutants, as well as **Claims 12, 13, 16 and 17**, which concern a method for the enzymatic production of terminally or subterminally hydroxylated aliphatic carboxylic acids, cannot be recognised to be novel over D1 and therefore do not meet the requirements of PCT Article 33(2).

Claims 6 and 15, which concern a specific mutant (V26T), meet the requirements of PCT Article 33(3) because the available prior art neither describes nor suggests the special mutation.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

WIPO



REC'D 12 NOV 2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/40434-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07252	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/00		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

I	<input checked="" type="checkbox"/>	Grundlage des Berichts
II	<input type="checkbox"/>	Priorität
III	<input checked="" type="checkbox"/>	Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV	<input type="checkbox"/>	Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
V	<input checked="" type="checkbox"/>	Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
VI	<input type="checkbox"/>	Bestimmte angeführte Unterlagen
VII	<input type="checkbox"/>	Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
VIII	<input type="checkbox"/>	Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 22/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts: 07.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Kalsner, I Tel. Nr. +49 89 2399 8708 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-27 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-17 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/2-2/2 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-16, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 3-17 (teilweise).

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
 - ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
 - ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 3-17 (teilweise) wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	6, 15
	Nein: Ansprüche	1-3, 7-13, 16, 17
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	6, 15
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-3, 6-13, 15-17
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

Zu Abschnitt V: Begründung hinsichtlich Neuheit, erfinderischer Tätigkeit und gewerblicher Anwendbarkeit

1) Dokumente

D1...Maves et al. (1997) FEBS Letters 414: 213-218

2) Neuheit und erfinderische Tätigkeit

Die vorliegende Anmeldung bezieht sich auf modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenasen, insbesondere solche aus *Bacillus megaterium*, die durch Mutationen in ihrem Substrat-bindenden Bereich ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Substratprofil zeigen, Nukleinsäuresequenzen, die dafür kodieren, sowie darauf basierende Expressionskonstrukte, Vektoren und rekombinante Mikroorganismen. Desweiteren wird ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren, in welchem ein solches modifiziertes Cytochrom P450 bzw. ein solcher rekombinanter Mikroorganismus verwendet wird, beschrieben.

D1 beschreibt eine Mutante von Cytochrom P450 aus *B. megaterium*, bei dem Pro-25 zu Glu mutiert wurde. Tests, in denen Substrate mittels der Mutante umgesetzt wurden, zeigen ein verändertes Substratprofil und veränderte Hydroxylierungs-Spezifität (bevorzugte Hydroxylierung der ω -3-Position durch die Mutante).

Ansprüche 1-3 und 7-11, die sich auf die modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase-Mutante beziehen, sowie **Ansprüche 12, 13, 16 und 17**, die sich auf ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von terminal oder subterminal hydroxylierten aliphatischen Carbonsäuren beziehen, können gegenüber D1 nicht als neu anerkannt werden und entsprechen demnach nicht den Erfordernissen von Art. 33(2) PCT.

Anspruch 6 und Anspruch 15, die sich auf eine spezifische Mutante (V26T) beziehen, entsprechen den Erfordernissen von Art. 33(3) PCT da die spezielle Mutation weder im vorliegenden Stand der Technik beschrieben noch nahegelegt

ist.

